

教育講演 最近の話題

3. エンドセリンの細胞内情報伝達機構

東京医科歯科大学第二内科 丸茂 文昭 伊藤 宏 寺田 典生 坂本 尚登

Key words : エンドセリン, 細胞内情報伝達, 心筋, 腎

はじめに

エンドセリン (ET-1) は, Masakiら<sup>1)</sup>によって血管内皮より分泌されて血管平滑筋に働き, これを収縮せしめることを主作用とする21個のアミノ酸よりなるペプチドであることが示された。正常人の血漿中には, わずか $0.61 \pm 0.21 \text{fmol/ml}$  ( $n=16$ ) しか含有されていない微量のホルモンである<sup>2)</sup>。血管に特有のホルモンであるものの, 循環ホルモンであるのかパラクリンが主体であるのか議論が多かった。ところがShichiriら<sup>3)</sup>によりヒト癌細胞培養株上清中よりET-1が測定され, 血管以外の細胞からもET-1が分泌されていることが明らかになり, にわかには全身の臓器におけるET-1の分泌とその作用についての検討が行われるようになった。今回はET-1の作用のひとつである増殖作用に焦点を合わせて, この点についてのupdateな話題を提供したいと思う。

1. 心筋細胞肥大作用

ラット胎児心筋初代培養細胞のET-1添加群と対照を比較すると, 図1に示すように明らかにET-1により細胞の肥大が認められる<sup>4)</sup>。イメージアナライザによる計測では表面積が対照の2.2倍に増加していた。培養細胞を *in situ* hybridization 法によってET-1の発現をみると, 図2のように明らかに肥大した心筋細胞中に見られる。この系で

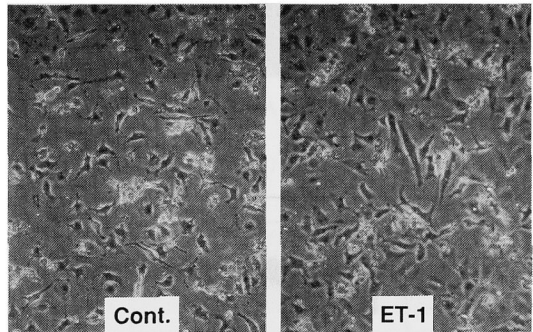


図1. ET-1による培養心筋細胞の肥大。胎児ラット心筋細胞を培養し, FCS (fetal calf serum)-freeの条件下でET-1の心筋肥大効果を見た (文献4)より引用)

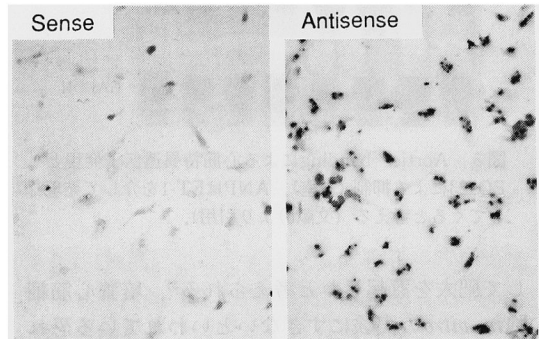


図2. 培養心筋細胞の *in situ* hybridization法によるET-1 mRNA発現。antisenseに明らかにET-1 mRNAの発現が認められる。ラット胎児心筋細胞のprimary cultureを用いている (文献5)より引用)

はET-1は加えていないので, ET-1が培養心筋中より分泌されオートクリンとして再び心筋に作用

表1. Aortic banding (AOB) による変動(文献6)より引用)

Time of sacrifice	Operation and treatment	n	Aortic systolic pressure (mmHg)	LV weight (mg)	Cell diameter ( $\mu\text{m}$ )
				Body weight (g)	
1 week	Sham+saline	5	125 $\pm$ 7.4	2.31 $\pm$ 0.02	14.78 $\pm$ 0.16
	AOB+saline	5	164 $\pm$ 4.9*	2.70 $\pm$ 0.04*	16.64 $\pm$ 0.48*
	Sham+BQ123	5	118 $\pm$ 12.6	2.21 $\pm$ 0.04	14.76 $\pm$ 0.76
	AOB+BQ123	5	169 $\pm$ 6.0*	2.23 $\pm$ 0.14†	15.32 $\pm$ 0.48†
2 weeks	Sham+saline	5	117 $\pm$ 8.3	2.23 $\pm$ 0.06	15.38 $\pm$ 0.33
	AOB+saline	5	191 $\pm$ 15.0*	2.83 $\pm$ 0.13*	17.60 $\pm$ 0.66*
	Sham+BQ123	5	112 $\pm$ 3.6	2.29 $\pm$ 0.89	15.82 $\pm$ 0.45
	AOB+BQ123	5	180 $\pm$ 14.3*	2.72 $\pm$ 0.10*	17.40 $\pm$ 0.70*

n, number of rats; AOB, aortic banding; LV, left ventricle

\* $p < 0.05$  as compared to sham operated group, † $p < 0.05$  as compared to AOB+saline group.

Values are mean $\pm$ SEM

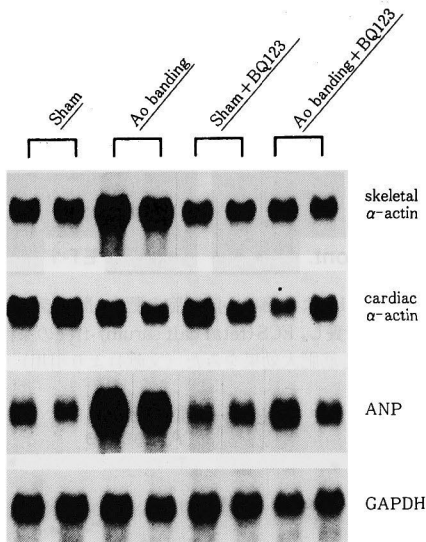


図3. Aortic bandingによる心筋特異遺伝子発現とBQ123による抑制(左室). ANPはET-1を介して発現してくると考える(文献6)より引用).

して肥大を惹起したと考えられる<sup>5)</sup>. 培養心筋細胞*in vitro*の実験にすぎないといわれている恐れがあるため, 続いてラットのaortic banding心筋肥大, 心肥大モデルを用い, ET<sub>A</sub>受容体のspecific inhibitorであるBQ123により心筋肥大, 心肥大が抑制されるか否かを検討した. 表1に示すように, aortic banding (AOB) 群はsham operation群に比して術後1, 2週目とも大動脈収縮期圧, 心重

量および摘出した心筋細胞径とも有意な増加をみている. このことは, AOBにより左心室圧は上昇して心筋肥大に基づく心肥大が惹起されたことが示される. ET<sub>A</sub>受容体特異的阻害薬であるBQ123により心肥大が抑制されたことはET-1がET<sub>A</sub>受容体を介して*in vivo*でも心筋肥大を起させていることが予想される. このことは, 図3のNorthern blot analysisにみられるようにAOB群にのみskeletal  $\alpha$ -actin mRNAの発現増大がみられることで支持される<sup>6)</sup>. ET-1によるskeletal  $\alpha$ -actin発現増加は*in vitro*実験で既に証明されているので, *in vivo*でもET-1がET<sub>A</sub>受容体を介して心筋肥大を惹起させることが示されたといえよう.

## 2. 腎におけるエンドセリンおよびエンドセリン受容体の発現とその作用

既に報告しているように<sup>7)</sup>, RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) 法によりET-1 mRNAの発現をラットネフロン各部位でみると, 糸球体と集合管にのみ現われることが判っており, Southern blotでも同様の結果となる. 図4, 5はエンドセリン受容体mRNAのネフロン各部位での発現をみたものである<sup>8)</sup>. 図4 ET<sub>A</sub> receptor mRNAの発現をRT-PCR法でみたもので, ET<sub>A</sub>は糸球体および血管系に局在することが示される. ET<sub>B</sub>は図5にみるように糸球体と

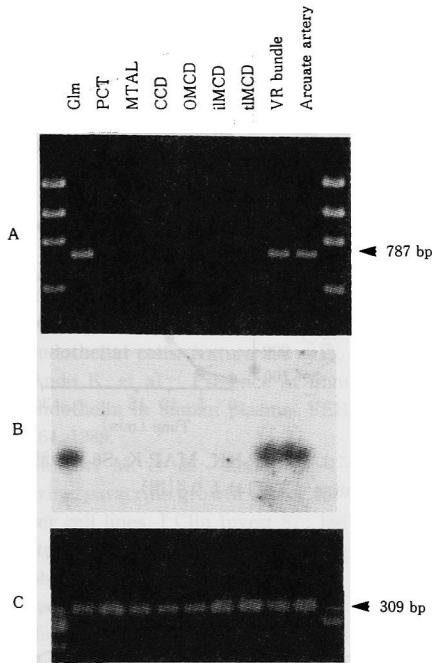


図4. ET<sub>A</sub>受容体mRNAのネフロン各部位での発現 AはET<sub>A</sub>受容体mRNAの発現部位を示す, BはSouthern blot analysis, Cはcontrol (GAPDH) glm:糸球体, PCT:近位尿管曲部, MTAL: Henle係蹄上行脚太い部分, CCD:皮質部集合管, OMCD:髄質部外層集合管, iIMCD:髄質部内層集合管起始部, t:集束部, VR bundle: vasa recta網, (文献8)より引用)

集合管なかでも乳頭部集合管 (IMCD) に強く発現をみる。

糸球体のET-1産生はメサンギウム細胞が主体ではないかと考えられている。培養メサンギウム細胞上清中のET-1濃度を測定したのが図6である<sup>11)</sup>。仔牛血清が入っていると種々の増殖因子等刺激物質が混入しているので、それらの物質がET-1分泌を刺激する可能性がある。仔牛血清の培養液中から除外しても培養血清中にET-1を認めるのでメサンギウム細胞がET-1を分泌しているのはこの面からも確認できる。このET-1がメサンギウムで何をしているかであるが、メサンギウムの収縮に関与しているであろうことは当然として

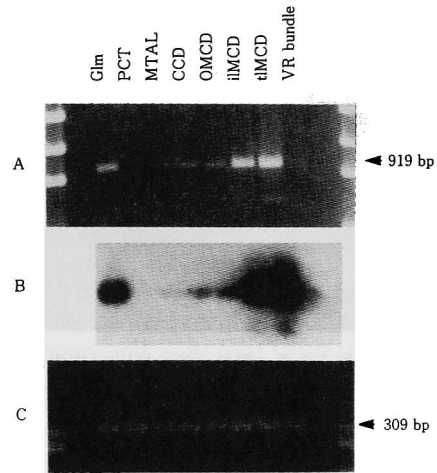


図5. ET<sub>B</sub>受容体のmRNAのネフロン各部位での発現 A~Cは図4と同様 (文献8)より引用)

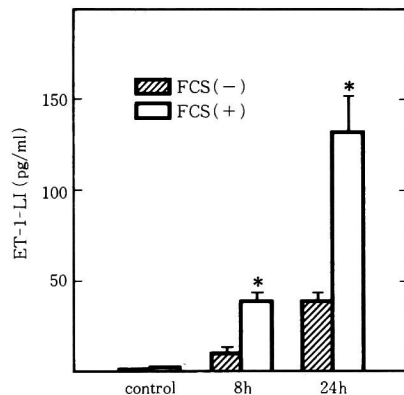


図6. 培養メサンギウムと上清中のET-1濃度 (文献9)より引用)

もET-1添加によってチミジンの取り込みが増加することから、ET-1が蛋白合成を促進していると考えられる。

### 3. エンドセリンと急性腎不全

ヒトの急性腎不全では血中ET-1の急激な上昇と腎不全の改善に伴う低下は既に報告した<sup>10)</sup>。最近、面白い事実がみつかった。ウサギ腎を阻血再

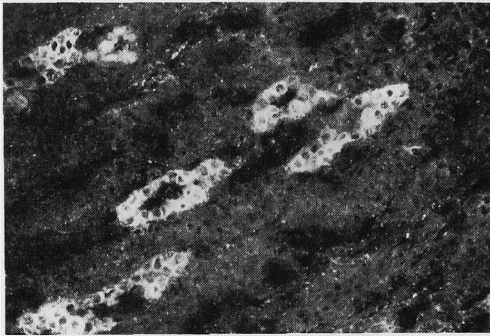


図7. 急性腎不全兔の腎集合管の抗ET-1抗体による染色。集合管のみ陽性で他のネフロン部位は陰性であった(文献11)より引用)

灌流により急性腎不全にして、摘出した腎をET-1抗体で染色すると図7の如く集合管にのみ陽性に染まり他の部位には全く陰性となる<sup>11)</sup>。血中ET-1は上昇せず、集合管より上位のネフロンにET-1の産生を認めないので、ET-1が他の部位で産生されて集合管のET<sub>B</sub>受容体に結合した可能性は否定できる。このET-1の意義づけとして次のことが考えられる。単離尿細管灌流実験のひとつとして、ET-1が集合管のNaClの再吸収を抑制する<sup>12)</sup>こと及び水の再吸収を抑制する<sup>13)</sup>ことが知られている。これらのことは、急性腎不全で体液が蓄積しようとする時、それを抑制する方向に働く作用であるから、急性腎不全で集合管のET-1産生が増加して水、NaClの再吸収を抑制することは一種の自動制御機構の働きではないかと思われる。勿論、効果としては微々たるものではあろうが。

#### 4. ET-1の蛋白合成促進作用機序について

心筋、糸球体などでET-1がET<sub>A</sub>あるいはET<sub>B</sub>受容体を介して蛋白合成を促進して細胞の肥大あるいは増殖をうながしていると考えられる。その細胞内機序として、まずMAP (mitogen-activated protein) kinase系が着目される。MAP kinase cascadeのET-1による活性化の時間経過を図8に

Sequential Activation of MAP-K cascade by ET-1 in glomeruli

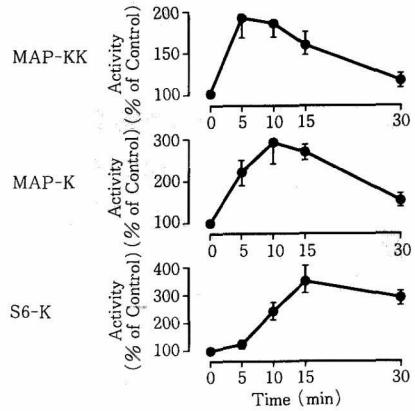


図8. ET-1によるMAP-KK, MAP-K, S6-Kの活性刺激のtime course (文献14)より引用)

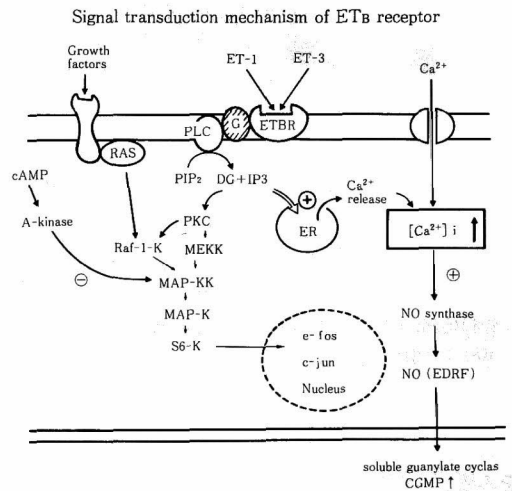


図9. MAP kinase cascadeとET-1の関連に関するシエーマ

示す<sup>14)</sup>。図にみるように活性のピークはMAP kinase kinase, MAP kinase, S6 kinaseと約5分ずつのずれがみられる。このことは、MAP-KK→MAP-K→S6-Kの流れでsignal transductionが動き、核内のc-fos, c-Junなどを刺激していくという仮説を支持する(図9)。この流れにPKC(protein kinase C), PKA (protein kinase A), PKG (protein kinase G) などがどのようにからむの

かPG<sub>s</sub>, NOなどがどう関与するのかはまだ十分解明されていない。いまや [Ca<sup>++</sup>]iに着目しているだけでは何事も解決されず, 細胞内情報伝達機構の解明は, 多くのリン酸化酵素などのクローニング, いろいろの条件下での各要素のcross-talkなどの面から明らかにしなければならないことが山積していると思われる。

#### 文 献

- 1) Yanagisawa M, et al: A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332: 411, 1988.
- 2) Ando K, et al: Presence of immunoreactive endothelin in human plasma. *FEBS Lett* 245: 164, 1989.
- 3) Shichiri M, et al: Endothelin-1 is an autocrine/paracrine growth factor for human cancer cell lines. *J Clin Invest* 87: 1867, 1991.
- 4) Ito H, et al: Endothelin-1 induces hypertrophy with enhanced expression of muscle-specific genes in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ Res* 69: 209, 1991.
- 5) Ito H, et al: Endothelin-1 is an autocrine/paracrine factor in the mechanism of angiotensin II-induced hypertrophy in cultured rat cardiomyocytes. *J Clin Invest* 92: 398, 1993.
- 6) Ito H, et al: Endothelin ET<sub>A</sub> receptor antagonist blocks cardiac hypertrophy provoked by hemodynamic overload. *Circulation* 89: 2198, 1994.
- 7) Ujiie K, et al: Messenger RNA expression and synthesis of endothelin-1 along rat nephron segments. *J Clin Invest* 90: 1043, 1992.
- 8) Terada N, et al: Different localization of two types of endothelin receptor mRNA in microdissected rat nephron segments using reverse transcription and polymerase chain reaction assay. *J Clin Invest* 90: 107, 1992.
- 9) Sakamoto H, et al: Production of endothelin-1 by rat cultured mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 169: 462, 1990.
- 10) Tomita K, et al: Plasma endothelin levels in patients with acute renal failure. *New Engl J Med* 321: 1127, 1990.
- 11) Marumo F, et al: Endothelin production in the collecting ducts of acute renal failure rabbits: An immunohistochemical study. (submitted for publication)
- 12) Tomita K, et al: Effects of ET-1 on water and chloride transport in cortical collecting ducts of the rat. *Amer J Physiol* F690, 1993.
- 13) Oishi R, et al: Endothelin-1 inhibits AVP-stimulated osmotic water permeability in rat inner medullary collecting duct. *Amer J Physiol* 261: F951, 1991.
- 14) Terada Y, et al: Presence and regulation of Raf-1 kinase, mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase, MAP kinase and S6 kinase in rat microdissected nephron segments. (submitted for publication)